

## Nieuwe ontwikkelingen van een oude aandoening: mastitis onder de loop

### Deel 1 - literatuuroverzicht

#### *New insights into an old problem: mastitis revisited Part 1- literature review*

<sup>1</sup>Y.H. Schukken, <sup>2</sup>S. Piepers, <sup>1</sup>, <sup>3</sup>R.N. Zadoks, <sup>2</sup>S. De Vliegher

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, VSA

<sup>2</sup>M-team en Onderzoekseenheid Mastitis en Melkkwaliteit, Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

<sup>3</sup>Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, Verenigd Koninkrijk

yschukken@cornell.edu

## SAMENVATTING

Mastitis is een aandoening die al lange tijd bij melkvee van groot belang is. Toch zijn er in de loop der jaren veel veranderingen opgetreden in het inzicht in de epidemiologie en pathobiologie van deze aandoening. In dit overzichtsartikel worden enkele van de belangrijkste nieuwe inzichten in mastitis beschreven die ontstaan zijn tijdens de laatste tien jaar. De belangrijkste nieuwe inzichten die in dit artikel besproken worden, zijn onder meer de moleculaire diagnostiek, mathematische modellen, immuunrespons, infectie en ontsteking in de transitieperiode, mastitis bij vaarzen en infectie en ontsteking veroorzaakt door coagulase negatieve stafylokokken.

## ABSTRACT

Mastitis is an important disease of dairy cattle. The disease has been around for a long time. Still, in the last decades, major changes in the understanding of the epidemiology and pathobiology of the disease have occurred. In this paper, the major changes in the understanding of bovine mastitis that have taken place in the last decade, are discussed. These major changes include molecular diagnostics, mathematical modeling, immune respons, infection and inflammation in the transition period, mastitis in heifers and infection and inflammation caused by coagulase negative *Staphylococci*.

## INLEIDING

Mastitis op westerse melkveebedrijven is economisch gezien de aandoening die het inkomen van de veehouder het meest bedreigt. Uiteraard kan een ontsteking van de uier in eerste instantie een pijnlijke en soms fatale aandoening voor de melkkoe zijn. Daarnaast heeft een koe met mastitis mogelijk een groot productieverlies tijdens de lactatie, ze heeft een grotere kans op (vervroegde) afvoer of sterfte en vormt een infectierisico voor de rest van de koppel. Het belang van mastitis is zowel voor het dier, de koppel als de veehouder doorheen de jaren niet veel veranderd. Zowel vroeger als nu was en is mastitis de belangrijkste endemische aandoening voor de westerse melkveehouderij.

Wat in de loop van de tijd echter wel veranderd is, is de distributie van de meest voorkomende mastitisveroorzakers en zeker de kennis van de diagnostiek, de epidemiologie en de pathobiologie van deze aandoening. In vrijwel alle landen waar over langere periodes gegevens over mastitispathogenen worden verzameld, blijkt namelijk dat er een belangrijke verschuiving in de distributie van de mastitisverwekkers is opgetreden. Ongeveer vijftig jaar geleden was mastitis vooral een subklinisch probleem met een hoog percentage van infecties veroorzaakt door *Streptococcus agalactiae* en *Staphylococcus aureus*. Mastitis is momenteel een combinatie van subklinische en klinische problemen en infecties worden vooral veroorzaakt door coliformen, zoals *Escherichia coli*, streptokokken, zoals *Streptococcus uberis* en *Strepto-*

*coccus dysgalactiae*, en coagulasenegatieve stafylokokken (CNS), zoals *Staphylococcus chromogenes* en *Staphylococcus epidermidis*, ook in Vlaanderen (Piepers et al., 2007). Het belang van *S. agalactiae* en *S. aureus* is in veel populaties veel kleiner geworden.

In dit overzichtsartikel worden een aantal nieuwe inzichten in de diagnostiek, de epidemiologie en de pathobiologie van mastitis samengevat.

## ONTWIKKELINGEN IN DE MOLECULAIRE DIAGNOSTIEK

Veel van de recent ontwikkelde kennis op het gebied van mastitis is tot stand gekomen dankzij de veel nauwkeurigere diagnostiek, gebruikmakend van moleculaire methoden, die vandaag beschikbaar is. Deze methoden zijn vooral gebaseerd op het knippen van DNA op specifieke plekken in het bacteriële genoom of op de 'polymerase chain reaction' (PCR). De PCR vermenigvuldigt specifieke componenten van het bacteriële DNA zodat het beschikbaar wordt voor verdere analyse. Dit kan bijvoorbeeld bestaan uit het vormen van bandenpatronen via elektroforese, de zogenaamde 'fingerprinting' of via sequentie-analyse. Een aantal toepassingen van deze diagnostische methoden worden in dit artikel besproken en gebruikt om de epidemiologie en pathobiologie van mastitis toe te lichten. De toepassingen zijn onder andere: 1) de primaire diagnostiek van mastitispathogenen, bijvoorbeeld PCR-diagnostiek op melk, 2) de nauwkeurige identificatie van de bacteriële soort (of species) binnen een genus, bijvoorbeeld de soort *S. chromogenes* binnen het genus van de stafylokokken, 3) de typering van stammen van een (bekende) soort/species, bijvoorbeeld verschillende stammen binnen het species *S. aureus*, 4) de identificatie van specifieke genen, bijvoorbeeld genen coderend voor antimicrobiële resistentie, binnen een bekende familie of soort.

### Primaire diagnostiek

De genoomsequenties van de belangrijkste mastitispathogenen zijn momenteel beschikbaar en worden gebruikt om diagnostische testen te ontwikkelen. Met name het gebruik van PCR voor de primaire diagnostiek van mastitispathogenen is al op de markt (Koskinen et al., 2009; Taponen et al., 2009). Deze commerciële PCR-test detecteert soortspecifieke genen met behulp van niet-gepubliceerde primers. Deze testen kunnen onder voorwaarden de primaire diagnostiek met behulp van bacteriële groei vervangen of complementeren (Taponen et al., 2009). Diagnostiek met behulp van PCR heeft als voordeel dat het sneller is en een zeer goede sensitiviteit en specificiteit kan bezitten (zie infra). Een recentelijk op de markt gebrachte test kan meerdere pathogenen met een real-time PCR-test diagnosticeren (Koskinen et al., 2009), waaronder *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae* en *S. uberis*. Een potentieel probleem met de hoge sensitiviteit van de PCR-diagnostiek is het aantonen van bacteriën in het melkstaal die

waarschijnlijk geen relatie hebben met het mastitisgeval. Als dezelfde criteria worden aangehouden als voor de diagnostiek gebaseerd op bacteriële groei, waarbij de aanwezigheid van drie of meer verschillende kiemen als 'verontreinigd' wordt beschouwd, dan kan de PCR-diagnostiek tot veel 'verontreinigde' resultaten leiden. De kans op verontreiniging is vooral groot indien niet-aseptisch genomen melkstalen worden getest. Een melkstaal genomen voor celgetalbegaling is een voorbeeld van een niet-aseptisch verzameld staal en leent zich dus niet voor PCR-diagnostiek. In tegenstelling tot de kweek toont de PCR ook de aanwezigheid van dode bacteriën aan. Dit kan als voordeel gezien worden, omdat bacteriën die tijdens transport of opslag verzwakt of gedood zijn, toch aangetoond kunnen worden. Het is echter ook een mogelijk nadeel omdat men zich moet afvragen of het aantonen van dode bacteriën wel een goede indicatie is voor het gebruik van antibiotica voor de behandeling van mastitis.

In een recent onderzoek werd de PCR-diagnostiek vergeleken met het bacteriologisch onderzoek op basis van kweek (Schukken et al., 2011a). Daarbij werden zowel aseptisch verzamelde monsters alsook de monsters verzameld voor celgetalonderzoek vergeleken. Op hetzelfde moment werd melk verzameld via een melkmeter tijdens het melken en werden ook monsters aseptisch verzameld na het melken, uiteraard na desinfectie van de tepel. Het aseptisch verzamelde staal werd gesplitst en onderzocht met de mastitis PCR-test (Pathoproof<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) en volgens het standaard bacteriologisch onderzoek. Het melkmonster verzameld uit de melkmeter werd alleen met de PCR-test onderzocht. De speciesidentiteit van kiemen gevonden bij het bacteriologisch onderzoek werd bevestigd met moleculaire diagnostiek (zie infra). Van de 31 aseptisch verzamelde kwartiermonsters waarbij tenminste in één van de testen een kiem werd gevonden, waren er acht waarbij de PCR-test drie of meer pathogenen aantoonde, terwijl dit er drie waren bij het bacteriologisch onderzoek. Enerzijds toont dit de verhoogde gevoeligheid van de PCR-test aan, anderzijds laat het ook zien dat deze verhoogde gevoeligheid kan resulteren in een hoger aantal monsters dat beoordeeld wordt als zijnde verontreinigd. Van de acht aseptisch verzamelde monsters die volgens de PCR-test verontreinigd waren (drie of meer pathogenen), waren er twee ook volgens het bacteriologisch onderzoek verontreinigd, drie positief voor *S. uberis*, één voor *S. dysgalactiae* en twee positief voor *Bacillus*. Van de drie verontreinigde monsters volgens het bacteriologisch onderzoek waren er ook twee verontreinigd volgens de PCR-test en één was positief voor *E. coli* volgens de PCR-test. Van de overige 23 aseptische kwartiermelkstalen gaven de twee testen in 21 gevallen een identieke uitslag. Voor één monster gaf de PCR-test een *S. uberis*-uitslag terwijl het bacteriologisch onderzoek negatief was; voor één monster was de bacteriologie positief voor *S. uberis* en de PCR-test negatief.

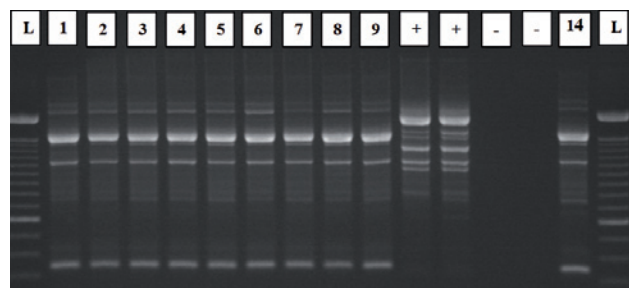
De monsters verzameld door de melkmeter gaven met de PCR-test grotendeels ofwel meer dan drie pathogenen per melkmonster, ofwel verontreinigde resultaten (82%). De overige 18% kwam overeen met de resultaten van het bacteriologisch onderzoek, voornamelijk *S. uberis* en *S. dysgalactiae*. De verontreinigde monsters waren gemiddeld PCR-positief voor vijf kiemen, waarvan de meeste melkmonsters in de PCR-test *Klebsiella* spp., *Enterococcus*, *Trueperella pyogenes* (voorheen *A. pyogenes*) en *Peptococcus indolicus* positief waren. Geen van deze kiemen werd gevonden in het bacteriologisch onderzoek op het aseptisch verzamelde melkmonster. Concluderend kwamen bij de analyse van aseptisch verzamelde en niet-verontreinigde melkmonsters, de resultaten bekomen met de PCR-test en het standaard bacteriologisch onderzoek goed overeen. Voor niet-aseptisch verzamelde stalen gaf de PCR-test voornamelijk verontreinigde resultaten. In een recent Deens onderzoek werd eveneens geconcludeerd dat aseptisch verzamelde monsters de voorkeur verdienen (Mahmmod et al., 2013).

### Nauwkeurige identificatie van de soort

De nauwkeurige diagnostiek van een bacteriële soort is van groot belang gebleken voor bijvoorbeeld streptokokken, stafylokokken en coliformen. Recent onderzoek wees uit dat de klassieke biochemische methoden voor de differentiatie van de soorten binnen de groep van de CNS zeer onbetrouwbaar zijn (Sampimon et al., 2009b; Koop et al., 2012). Met behulp van moleculaire technieken, zoals 'amplified-fragment length polymorphism' (AFLP) (Piessens et al., 2010), 'tRNA intergenic spacer PCR' (tDNA PCR) (Supré et al., 2009), GTG<sub>5</sub> PCR (Braem et al., 2011) en sequentie-analyse van huishoudgenen, bijvoorbeeld het 16S, cpn60, rpoB, sodA of het tufgen, (Zadoks en Watts, 2009) is het wel mogelijk de verschillende CNS-soorten van elkaar te onderscheiden. Voor een goed begrip van de epidemiologie en pathobiologie van intramammaire infecties (IMI) is het van groot belang dat de soortidentificatie accuraat gebeurt.

### Stamtypering

De typering van bacteriële stammen binnen een soort geeft potentieel heel veel informatie over de manier van transmissie van bacteriestammen binnen of tussen bedrijven. Stamtypering kan op veel verschillende manieren worden uitgevoerd en is in grote lijnen op te splitsen in 1) het beoordelen van de grootte van DNA-fragmenten en 2) het uitvoeren van sequentieanalyses. Het beoordelen van de grootte van DNA-fragmenten gebeurt in stukken door het knippen van DNA met behulp van restrictie-enzymen, bijvoorbeeld 'pulsed field gel electrophoresis' (PFGE) of het vermenigvuldigen van specifieke stukjes van dat DNA door middel van PCR (Zadoks en Schukken, 2006). De 'randomly amplified polymorphic DNA' (RAPD)-analyse wordt hierna als voorbeeld



**Figuur 1.** Tien *Streptococcus uberis*-isolaten van klinische mastitisgevallen op een melkveebedrijf (rij 1-9 en 14). Alle tien hebben hetzelfde unieke bandenpatroon, wat aangeeft dat het om één en dezelfde stam gaat. L: DNA-ladder, +: positieve controles, -: negatieve controle, W: watercontrole.

gebruikt. Bij deze methode worden met behulp van korte primers (een primer is een klein stukje, meestal 10 tot 40 basen, DNA of RNA dat gebruikt wordt als startpunt van de PCR-reactie) stukken van het DNA geamplificeerd (vermenigvuldigd). Hierdoor wordt er per stam een specifieke serie van stukjes DNA vermenigvuldigd. Deze stukjes DNA worden dan door middel van een elektroforesereactie zichtbaar gemaakt. De kortere DNA-fragmenten migreren sneller door de gel. Als vervolgens het DNA zichtbaar wordt gemaakt, ontstaat een stamspecifiek bandenpatroon, de zogenaamde 'fingerprint' (Gurjar et al., 2012; Zadoks en Schukken, 2006) (Figuur 1). Het onderscheidend vermogen van de verschillende stamtyperingsmethoden kan nogal verschillen tussen bacteriële soorten en vandaar is het van waarde om meerdere stamtyperingsmethoden te vergelijken.

### Omgevingsgebonden, contagieus of allebei?

Mastitispathogenen werden in het verleden vaak opgedeeld in omgevingskiemen en besmettelijke of contagieuze kiemen. Het verschil tussen deze twee groepen is de infectiebron van de kiemen. Voor de besmettelijke kiemen is de infectiebron een andere koe, terwijl de omgevingskiemen vooral uit de omgeving van de koe komen (Zadoks et al., 2011b).

De waarde van deze verdeling ligt in de specifieke aanpak van mastitisproblemen veroorzaakt door deze twee soorten kiemen. Bij besmettelijke kiemen is de aanpak gebaseerd op het afscheiden, behandelen en afvoeren van de geïnfecteerde dieren samen met een verbetering van de melktechniek, wat leidt tot een verbetering van de mastitisproblematiek. Bij omgevingskiemen is de aanpak gebaseerd op het verbeteren van de afweer van de koe, bijvoorbeeld door voeding of vaccinatie, en op de hygiëne in de omgeving, bijvoorbeeld de looppaden, de ligboxen of standen en de tepel- en uierhuid.

Kiemen worden vaak ingedeeld in deze twee groepen, hoewel dat niet altijd even gemakkelijk of correct is. Hoewel veel bacteriesoorten van oudsher als besmettelijke kiem of omgevingskiem aangeduid wor-



den, is *E. coli* een van de weinige species waarvoor besmettelijke transmissie niet is aangetoond. Voor veel andere belangrijke mastitisverwekkers, inclusief *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* en *Klebsiella pneumoniae*, zijn er aanwijzingen dat zowel besmettelijke transmissie als overdracht via de omgeving mogelijk is, al neemt de kans op besmettelijke transmissie af in de volgorde waarin de bacteriën hierboven zijn weergegeven (Gurjar et al., 2012; Zadoks and Schukken, 2006; Zadoks et al., 2011b). Er zijn ook kiemen die niet zo gemakkelijk in te delen zijn; voorbeelden hiervan zijn *Serratia*, *Enterobacter*, *Prototheca*, CNS, gisten en schimmels.

Met de ontwikkeling van meer nauwkeurige diagnostische methoden is het nu echter mogelijk geworden om de definitie van ‘besmettelijk’ en ‘omgevingskiem’ te baseren op moleculaire diagnostiek. Bij besmettelijke kiemen laten alle IMI dezelfde stam van hetzelfde species zien, terwijl omgevingskiemen een unieke stam laten zien bij elke IMI, tenzij er sprake is van een puntbron in de omgeving. Wanneer deze moleculair onderbouwde definitie wordt gebruikt, blijkt dat in veel gevallen de klassieke indeling van de kiemen in besmettelijk en omgevingsgebonden niet klopt (Figuur 1). Een uitbraak van *S. uberis*-mastitis op een melkveebedrijf laat tien identieke bandenpatronen zien in tien klinische mastitis gevallen. Dit is een sterke aanwijzing voor een besmettelijke overdracht van kiemen van koe naar koe. Op basis van alleen deze gegevens kan een puntbron vanuit de omgeving echter niet uitgesloten worden (zie infra).

### Gendetectie

Het aantonen van specifieke genen in het bacteriële DNA is van belang voor de beoordeling van de pathogeniteit, voor het evalueren van antimicrobiële resistentie of in sommige gevallen voor het identificeren van een bacteriesoort als er een soortspecifiek gen aanwezig is, bijvoorbeeld het *S. aureus*-specifieke *clfA*-gen. Specifieke genen kunnen ook gebruikt worden voor stamtypering. Dit wordt gebruikt bij het zogenaamde ‘multi locus sequence typing’ (MLST) of bij ‘short sequence repeat’ (SSR)-methoden. Specifieke genen worden geïdentificeerd met behulp van specifieke primers die gemaakt zijn om slechts één specifiek onderdeel van het bacteriële genoom te amplificeren. Een belangrijke toepassing in de diagnostiek en epidemiologie van mastitis is het aantonen van genen die coderen voor antimicrobiële resistentie. Uit een recente studie blijkt dat het *mecA*-gen, dat verantwoordelijk is voor methicillineresistentie van *S. aureus*, gevonden kan worden bij ongeveer 13% van CNS geïsoleerd uit mastitismelk. In het geval van *S. epidermidis* is dit zelfs bij 30% van de isolaten (Sampimon et al., 2011). Bij omgevingsgebonden CNS, bijvoorbeeld *S. sciuri* en *S. fleurettii*, komt het *mecA*-gen nog vaker voor al is het niet altijd duidelijk of dit gen

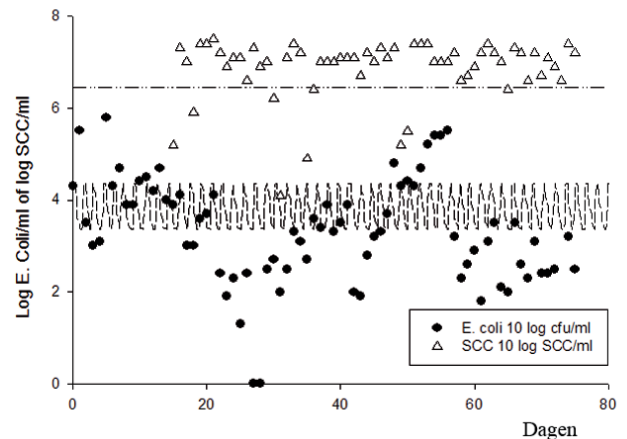
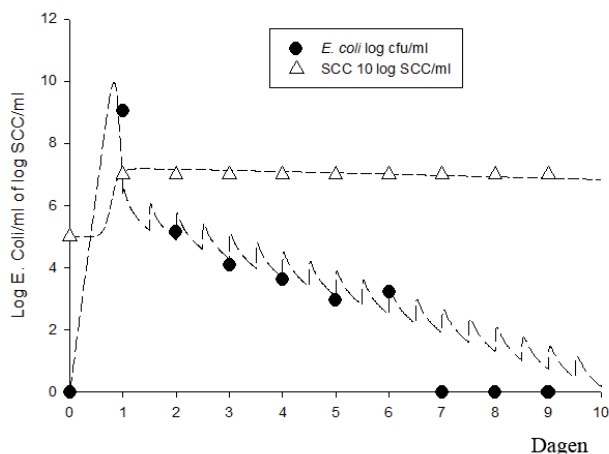
fenotypisch tot uitdrukking gebracht wordt (Piessens et al., 2012; Sampimon et al., 2011).

### MATHEMATISCHE MODELLEN VOOR MASTITIS

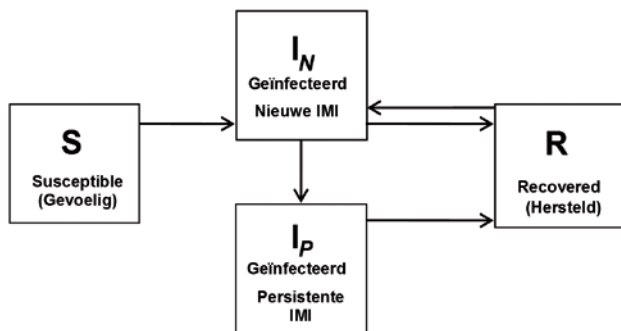
Intramammaire infecties gedragen zich zowel binnen een koe als binnen een bedrijf op een complexe manier. Infecties zijn transiënt of persistent en het is niet altijd duidelijk wat de reden is waarom een infectie ofwel van korte duur of van lange duur is. Een ander voorbeeld van complexe interacties is de impact van het behandelen van koeien met mastitis, niet alleen op de koe maar ook op de koppel. Dieren die niet meer geïnfecteerd zijn, scheiden immers geen bacteriën meer uit en dragen dus niet meer bij tot de verspreiding van infectie. Het effect van een behandeling is echter afhankelijk van de bedrijfsvoering (Barlow et al., 2009). Zowel op het niveau van de pathobiologie binnen het individuele dier als op het niveau van de epidemiologie van mastitis hebben mathematische modellen de afgelopen jaren tot nieuwe inzichten geleid, zoals hieronder wordt toegelicht. Tenslotte kunnen mathematische modellen een rol spelen in het simuleren van behandelingen of preventieve maatregelen die in de praktijk (nog) niet uitgetoetst kunnen worden (Zadoks et al., 2002; White et al., 2006).

#### Persisterende *E. coli*-infecties

Persisterende uierinfecties met *E. coli* zijn beschreven in zowel Europa als de Verenigde Staten van Amerika (Döpfer et al., 1999; Dogan et al., 2006; Almeida et al., 2011). De pathobiologie van deze persisterende infecties is echter nog niet opgehelderd. Sommige hypothesen geven aan dat de bacteriestam zelf verantwoordelijk is voor het al of niet persisteren van de infectie. Andere geven aan dat er geen belangrijke verschillen zijn tussen de *E. coli*-stammen die mastitis bij koeien veroorzaken. Om meer inzicht te krijgen in de mogelijke rol van *E. coli*-stammen en de afweer van de koe zijn er recent een aantal publicaties verschenen waar mathematische modellen van intramammaire *E. coli*-infecties zijn beschreven. Het mathematische model van Dettloux et al. (2006) is vooral gericht op het beschrijven van transiënte infecties terwijl het model van White et al. (2010) vooral gericht is op het verschil tussen transiënte en persisterende, intramammaire *E. coli*-infecties. Dat laatste model beschrijft op een erg nauwkeurige wijze de dynamiek van pro-inflammatoire en anti-inflammatoire cytokinen, de dynamiek van de afweercellen in de melk (zowel macrofagen als neutrofielen) en de dynamiek van *E. coli*-bacteriën in de melk en in een hypothetisch intracellulair compartiment. Dit wordt uitgevoerd op basis van gegevens van zowel transiënt als persisterend geïnfecteerde koeien en data verkregen uit in-vitro-infectie-experimenten die met verschillende *E. coli*-stammen worden gedaan (Dogan et al., 2006; Almeida et al., 2011). De belangrijkste verschillen tussen transiënte en persisterende



**Figuur 2. A.** De voorspellingen (lijnen) en de waarnemingen (punten/driehoeken) van het verloop van het kiemgetal en het kwartiercelgetal gedurende een transiënte *E. coli*-infectie. **B.** De voorspellingen (lijnen) en de waarnemingen (punten/driehoeken) van persisterende infecties. (Naar: White et al., 2010).



**Figuur 3.** Mathematisch model om het belang van lactatithherapie op de subklinische infectieprevalentie in te schatten. S: gevoelige kwartieren.  $I_N$ : kwartieren met een nieuwe infectie.  $I_P$ : kwartieren met een persistente infectie, R: herstelde kwartieren. (Naar: Barlow et al., 2009).

infecties zitten in de capaciteit van de *E. coli*-bacteriën om uierpitheelcellen te invaderen en in de overlevingscapaciteit van de bacteriën in deze epitheelcellen. Een model waar deze parameters de waarden hebben die bij transiënte stammen worden gevonden, is weergegeven in Figuur 2A, terwijl een model met de waarden van persistente stammen is weergegeven in Figuur 2B. Uit deze figuren blijkt dat de modellen de waarnemingen heel nauwkeurig voorspellen en dat de kiemeigenschappen in staat zijn om de uitkomst van de infectie te voorspellen (transiënt of persistent) (White et al., 2010). Met behulp van het mathematische model wordt een beter en meer betrouwbaar inzicht verkregen in het belang van intracellulaire reservoirs voor *E. coli*-kiemen.

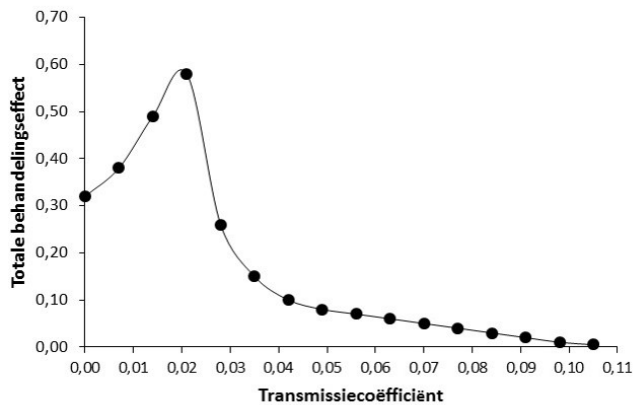
### Therapie van subklinische infecties: waardeloos of waardevol

De behandeling van subklinische mastitiden wordt in de meeste gevallen niet aangeraden omdat

het financieel niet aantrekkelijk is. De uitzondering is de behandeling van *S. agalactiae* in het geval van een bedrijfsbehandeling (De Vliegheer et al., 2003a). Dat behandelen van subklinische mastitisgevallen niet economisch verantwoord is, werd recentelijk tegen het licht gehouden. De studie van Barlow et al. (2009) is gebaseerd op een mathematisch model gecombineerd met data uit een grote veldstudie waar de behandelingsresultaten werden getoetst onder veldomstandigheden (Figuur 3). In dit mathematisch model bevinden de kwartieren zich in één van de volgende vier klassen: 1. gevoelig of S, 2. nieuw geïnfecteerd of  $I_N$ , 3. persistent geïnfecteerd of  $I_P$  en 4. hersteld of R. Als er een nieuwe infectie plaatsvindt, gaat een kwartier van de 'S-klasse' naar de ' $I_N$ -klasse'. Een kwartier kan dan snel genezen en naar de 'R-klasse' overgaan of langdurig geïnfecteerd blijven en naar de ' $I_P$ -klasse' behoren. Vanuit de persistent geïnfecteerde klasse kunnen kwartieren genezen, het meest waarschijnlijk na een antibioticumbehandeling.

Nieuwe infecties worden voor een deel veroorzaakt door infecties vanuit de omgeving en voor een deel door de besmettelijke transmissie vanuit een ander geïnfecteerd kwartier (Zadoks et al., 2002; Lam et al., 1996). Een belangrijke component van het model is dat kwartieren die hersteld zijn van infectie ook opnieuw geïnfecteerd kunnen worden, dus teruggaan van R naar  $I_N$ . Uit de veldgegevens en uit gepubliceerd onderzoek blijkt dat de kans op herinfectie ongeveer drie keer zo groot is als de kans op de eerste infectie (Zadoks et al., 2002).

Vervolgens wordt de impact van een intramammaire therapie van de persistent geïnfecteerde kwartieren geëvalueerd. Het therapie-effect wordt beoordeeld als een 'direct effect', waarbij de impact van de behandeling op het behandelde kwartier zelf wordt beoordeeld. Een 'indirect behandelingseffect' wordt gedefinieerd als het effect van de behandeling van een geïnfecteerd kwartier op de reductie van nieuwe



**Figuur 4.** De relatie tussen de transmissiecoëfficiënt,  $\beta$  en het geschatte totale behandelingseffect van een antibioticumtherapie tijdens lactatie. (Naar: Barlow et al., 2009).

infecties vanuit dit geïnfecteerde kwartier. Als een kwartier geneest, dan scheidt het geen kiemen meer uit die een volgend kwartier kunnen infecteren. Het totale behandelingseffect is de combinatie van het directe en indirecte effect en kan gedefinieerd worden als:  
 $1 - (\text{prevalentie in de behandelde populatie} / \text{prevalentie in de controlepopulatie})$ .

Het totale behandelingseffect is zeer sterk afhankelijk van de transmissiecoëfficiënt. Deze coëfficiënt geeft aan hoe groot de kans is dat een infectie van het ene geïnfecteerde naar het volgende nog niet-geïnfecteerde kwartier overgaat. De relatie tussen de transmissiecoëfficiënt en het behandelingseffect wordt weergegeven in Figuur 4. De relatie is duidelijk niet-lineair. In eerste instantie stijgt het totale behandelingseffect met een toename van de transmissiecoëfficiënt. Dit wordt veroorzaakt door een toename van het indirecte behandelingseffect: een genezen kwartier heeft geen kans om een nieuwe infectie te veroorzaken. Bij een toename van de transmissiecoëfficiënt blijkt het behandelingseffect echter kleiner te worden en uiteindelijk zelfs lager te worden dan het directe behandelingseffect. De reden hiervoor is dat de kwartieren die door behandeling zijn genezen, gemakkelijk opnieuw geïnfecteerd worden bij een snelle overdracht van infectie. Het directe behandelingseffect blijft gelijk (een kwartier geneest nog steeds na behandeling), maar het indirecte behandelingseffect wordt negatief. Het nettoresultaat van behandeling wordt dan ook heel erg klein. De transmissiecoëfficiënt is niet gemakkelijk af te lezen uit veldgegevens maar vergt vrij nauwkeurige gegevens en complexe analyses. In meerdere studies werd de transmissiecoëfficiënt geschat en als vuistregel kan gelden dat bedrijven met een goed uiergezondheidsmanagement, inclusief een goede melktechniek en het dippen van de tepels na het melken, de transmissiecoëfficiënt kleiner is dan 0,03 (Lam et al., 1996; Zadoks et al., 2001a, 2002). Bij

bedrijven waar deze uiergezondheidsmaatregelen niet aanwezig zijn, is de transmissiecoëfficiënt veel hoger.

Uit Figuur 4 blijkt dat het indirecte behandelingseffect op bedrijven heel groot kan zijn. Het kan het totale effect verdubbelen, hetgeen ook economische consequenties met zich meebrengt. Het indirecte behandelingseffect bepaalt of behandelen tijdens lactatie wel of niet economisch rendabel is. Als met dit indirecte effect geen rekening wordt gehouden, is behandelen economisch niet haalbaar. Met het indirecte effect in het economische model blijkt de behandeling van subklinische mastitis echter toch economisch verantwoord (Swinkels et al., 2005a, 2005b).

De bevindingen uit dit mathematische model zijn ook getoetst op praktijkbedrijven. Barlow et al. (2013) beschreven een onderzoek voor het opmeten van zowel het directe als indirecte effect van lactatietherapie. Uit dit onderzoek blijkt dat er een significant indirect effect van de lactatietherapie op het populatieniveau kan gemeten worden.

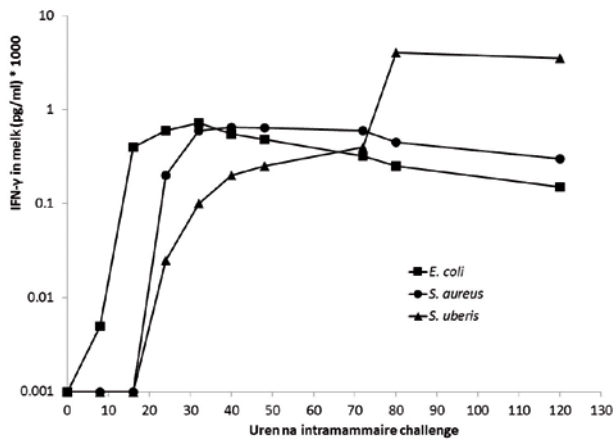
Een belangrijke conclusie uit dit onderzoek is dat behandelingsstrategieën bedrijfsspecifiek zijn. Op bedrijven met een hoge transmissie van pathogenen is de behandeling van subklinische infecties niet aan te raden en is het beter om aandacht te besteden aan andere managementmaatregelen. Ook op bedrijven zonder transmissie is het effect van behandeling beperkt tot het directe behandelingseffect. Juist op bedrijven met een relatief goed uiergezondheidsmanagement en enige mate van transmissie is de behandeling van subklinische mastitis economisch verantwoord.

## ONTWIKKELINGEN IN DE KENNIS VAN DE IMMUNRESPONS IN DE UIER

In de afgelopen jaren is er veel kennis opgedaan van de immuunrespons ter hoogte van de uier. In grote lijnen wordt de immuunrespons gekenmerkt door twee componenten: de aangeboren en de geadapteerde immuunrespons. Met name de kennis van de aangeboren immuniteit is sterk toegenomen.

De aangeboren immuniteit werkt zonder de aanwezigheid van een 'geheugen'. De reactie is volledig ingebouwd en onafhankelijk van een eerdere blootstelling aan pathogenen. Initieel werd deze immuunrespons ook wel aspecifieke respons genoemd, maar in de afgelopen jaren is het duidelijk geworden dat deze immuunreactie wel degelijk reageert op de antigenen waarmee het in aanraking komt. Deze specifieke herkenning wordt veroorzaakt door een unieke binding tussen de zogenaamde pathogeengeassocieerde moleculaire patronen (PAMP) en een specifieke receptor, 'toll-like receptor' (TLR) genoemd, aanwezig op de celwand van de afweercellen. Er zijn momenteel 13 verschillende TLR's beschreven (Schukken et al., 2011b), waarvan er in elk geval tien bekend zijn bij het rund (Werling et al., 2009). Voorbeelden zijn de herkenning van 'lipoteichoic acid' (LTA), dat vooral in de celwand van grampositieve bacteriën gevonden wordt door TLR2 en de herken-





**Figuur 5. Cytokineprofiel van interferon- $\gamma$  van intramammaire infecties met *E. coli*, *S. aureus* en *S. uberis*. Gebaseerd op challenge-infecties beschreven door Bannerman et al., (2009).**

ning van lipopolysaccharide (LPS), dat in de celwand van gramnegatieve bacteriën gevonden wordt door TLR4. Deze specifieke binding van celwandcomponenten vindt plaats in de uier, waar zowel de macrofagen als de uierepitheelcellen in staat zijn om de aangeboren immuniteit aan te sturen. De combinatie van PAMPs en de kiem leidt ertoe dat er een heel specifiek immuunresponspatroon bestaat voor de belangrijkste mastitispathogenen. Bannerman et al. (2009) toonden dit aan voor wat betreft cytokinepatronen (Figuur 5) maar een vergelijkbare specifieke respons is ook herkenbaar in meer klinische parameters, zoals celgetalpatronen (De Haas et al., 2004), melkverliespatronen (Gröhn et al., 2004; Wilson et al., 2004) en pathogeenspecifieke afvoerrisico's (De Haas et al., 2004; Gröhn et al., 2005; Bar et al., 2004). Het cytokinepatroon van interferon- $\gamma$  van *E. coli*, *S. aureus* en *S. uberis* wordt weergegeven in Figuur 5. De verschillende patronen zijn heel duidelijk: *E. coli* laat een snelle stijging zien na infectie, bij *S. aureus* is de reactie vertraagd en in het algemeen iets lager dan de stijging bij de andere kiemen, terwijl het patroon van *S. uberis* een stijging laat zien die laat op gang komt maar uiteindelijk heel hoog doorstijgt en vooral van lange duur is. Deze patronen in interferon- $\gamma$  komen in grote lijnen overeen met de klinische verschijnselen die bij de verschillende kiemen worden waargenomen. Een belangrijk verschil tussen *E. coli* enerzijds en *S. aureus* en *S. uberis* anderzijds is de vertraging van ongeveer 16 uur in de cytokinerespons (Schukken et al., 2011b). De mogelijke redenen voor de vertraging van de cytokinerespons zijn niet volledig duidelijk maar de vertraging van de cytokinerespons werd reeds in verschillende experimenten aangetoond, zowel in vivo als in vitro (Schukken et al., 2011b; Günther et al., 2011). Naast de beschreven verschillen tussen bacteriesoorten bestaan er ook verschillen binnen bacteriesoorten. Veel gepubliceerde onderzoeken met *S. uberis* zijn gebaseerd op het gebruik van de *S. uberis*-stam O140J die zowel in vitro

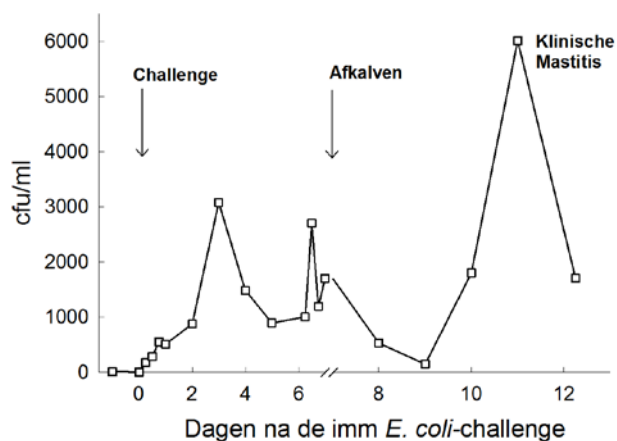
als in vivo gebruikt is en ernstige klinische mastitis veroorzaakt. Onderzoek met andere stammen laat zien dat de klinische respons en het cytokineprofiel, inclusief het interferon-g-niveau, een ander verloop vertonen na infectie met andere *S. uberis*-stammen (Rambeaud et al., 2003; Tassi et al., 2013).

De geadapteerde immuunrespons is dan weer gebaseerd op een heel specifieke respons die aangemaakt wordt na de blootstelling aan een bacterie. De geadapteerde immuniteit na een IMI blijkt slechts een kortdurende bescherming te geven. In een aantal recente studies werd enerzijds gevonden dat een tweede experimentele IMI met een *E. coli*-bacterie binnen de twee weken na de eerste experimentele infectie resulteert in een minder ernstige uierontsteking (Suojala et al., 2008). Anderzijds geeft een studie van herhaalde klinische gevallen bij dezelfde koe echter aan dat als de klinische gevallen met meer dan 14 dagen tussentijd voorkomen, er geen bescherming optreedt ten aanzien van de ernst van de klinische verschijnselen, zoals melkproductieverlies en afvoerkans (Schukken et al., 2009). Hoewel deze relatief beperkte beschermende immuniteit na een natuurlijke infectie betekent dat het ontwikkelen van effectieve mastitisvaccins niet evident is, wordt de waargenomen adaptieve immuunrespons toch gebruikt als argument om een vaccin te ontwikkelen. Vooral de op de *E. coli* J5-stam gebaseerde vaccins tegen coliforme mastitiden zijn veelvuldig onderzocht. Deze zogenaamde J5-vaccins blijken vooral van waarde te zijn in de bescherming van de koe tegen de ernstige consequenties van coliforme IMI (Tuchscher et al., 2008).

## INTRAMAMMAIRE INFECTIE EN MASTITIS IN DE TRANSITIEPERIODE

Klinische mastitis is vooral een probleem bij pasgekalvde melkkoeien. Ongeveer de helft van alle klinische gevallen vindt plaats in de eerste dertig dagen van de lactatie, doch dit percentage is bedrijfsspecifiek. Op sommige bedrijven is het aantal namelijk veel hoger terwijl op andere bedrijven de meeste gevallen van klinische mastitis veel later in de lactatie optreden. Klinische mastitis onmiddellijk na het afkalven komt veel voor omdat de koe dan gevoelig is voor infectie maar vooral ook omdat de op dat moment reeds bestaande intramammaire infecties door het afweersysteem herkend worden, hetgeen leidt tot een snelle ontstekingsreactie (Quesnell et al., 2012). Het is hierbij belangrijk om onderscheid te maken tussen de infectie, oftewel de aanwezigheid van een micro-organisme in de uier, en de ontsteking; dat wil zeggen de respons van de koe. Hoewel mastitis en intramammaire infectie in het spraakgebruik vaak als synoniemen worden gehanteerd, beschrijven deze termen biologisch verschillende processen. Dit verschil blijkt vooral van belang te zijn voor het begrijpen en bestrijden van klinische mastitis rond het moment van het afkalven.

Reeds vóór het afkalven is de uier geïnfecteerd.



**Figuur 6.** Verloop van een *E. coli*-infectie na een intramammaire challenge uitgevoerd in de laatste periode van de dracht. Op de figuur wordt het aantal kiemen (colony forming units (cfu)) weergegeven.

Deze infecties na het afkalven leiden tot klinische mastitis. Met behulp van moleculaire stamtyperingstechnieken wordt het duidelijk dat de infectie tijdens de late dracht en de klinische mastitis na het afkalven door dezelfde kiem kunnen worden veroorzaakt (Bradley en Green, 2004). Deze bevindingen hebben geleid tot een verandering in de focus van preventieprogramma's tegen klinische mastitis. De nadruk van deze programma's hoort te liggen op de laatste weken of maanden van de dracht en niet uitsluitend in de periode rond en na het afkalven.

De kennis van de immuunregulatie tijdens de late dracht is op dit moment nog erg beperkt. De mogelijkheden om deze kennis te verbeteren en om op basis daarvan therapeutische of preventieve mogelijkheden te scheppen zijn echter heel groot. In een recente experimentele infectiestudie werd een kwartier van een koe geïnfecteerd tijdens de droogstand en werd de infectie opgevolgd tot in de lactatie. De resultaten van het bacteriologisch onderzoek van deze experimentele infectie worden weergegeven in Figuur 6. Bij een infectie met 100 cfu van *E. coli* bleef de kiem aanwezig in de uier, ook na het afkalven. Ongeveer twee weken na het afkalven vond er een geval van klinische mastitis plaats. Moleculaire typering gaf aan dat alle kiemen die tijdens de studie werden gevonden tot dezelfde kloon behoorden, ongeacht de aanwezigheid van klinische verschijnselen ten tijde van de staalname. Tijdens de late dracht waren er geen klinische verschijnselen waar te nemen aan de uier of aan de koe. Er was geen sprake van zwelling, koorts of pijn aan de uier. De cytokineproductie tijdens de droogstand was vooral gericht op een anti-inflammatoire respons, met een dominante interleukine 10 (IL-10) reactie onmiddellijk na de experimentele infectie. Pas na het afkalven veranderde dit en tijdens de klinische mastitis waren alle klassieke symptomen van een acute inflammatoire respons aanwezig (Quesnell et al., 2012). Het is dus belangrijk om onderscheid

te maken tussen IMI en klinische mastitis. Voor de veehouder is vooral de klinische mastitis van belang, maar de preventie van klinische mastitis kan gebaseerd zijn op de preventie van een voorafgaande IMI.

De systemische respons na het afkalven bestaat uit koorts terwijl de lokale respons bestaat uit zwelling, pijn en roodheid. Veel van deze symptomen worden veroorzaakt door een zogenaamde Th-1 gedomineerde immuunreactie die gekarakteriseerd wordt door hoge concentraties van pro-inflammatoire cytokinen, zoals IL-1 en TNF- $\alpha$ . Deze cytokinen en hun fysiologische gevolgen hebben echter een negatieve invloed op de foetale ontwikkeling en het onderhoud van de dracht (Quesnell et al., 2012). Tijdens de late dracht is er sprake van een immuunrespons met een dominante Th-2-focus waarbij de nadruk ligt op de zogenaamde anti-inflammatoire cytokinen, zoals IL-10 en IL-4. De geobserveerde hoge kans op infectie tijdens de late dracht en de klinische mastitis tijdens de vroege lactatie zijn gebaseerd op een zorgvuldig uitgebalanceerd immuunsysteem dat er vooral op gericht is om de foetus en de moeder te beschermen.

De consequenties van deze bevindingen zijn dat de late dracht een heel belangrijke managementperiode voor de preventie van intramammaire infecties is. Tijdens deze periode dient de voeding goed afgestemd te zijn op de behoefte van de drachtige koe en de daaropvolgende postpartum periode. Uit recent onderzoek naar de toevoeging van vitamine E aan het dieet blijkt dat het belangrijk is om een optimaal uitgebalanceerd dieet te verstrekken en niet een dieet met maximale vitaminewaarden (Bouwstra et al., 2010). Verder dient er een uitgekiende bescherming te zijn tegen intramammaire infecties en is omgevingshygiëne van groot belang. Toekomstige mastitis preventieprogramma's zullen een veel grotere nadruk leggen op de late dracht en de droogstand van de hoogproductieve koe.

## NIEUWE INZICHTEN IN MASTITIS BIJ VAARZEN

Vaarzen verschillen van koeien bij het afkalven door het feit dat ze niet worden drooggezet met antibiotica en dat ze nog nooit werden gemolken. Daarnaast dient een deel van hun energie tijdens de eerste lactatie om verder te groeien. Ondanks het feit dat deze jonge dieren nog nooit werden gemolken en de aanwezigheid van een keratineplug de kwartieren zou moeten beschermen tegen infecties met omgevingskiemen, blijken heel wat dieren toch af te kalven met uiergezondheidsproblemen. Ze hebben een verhoogd celgetal, hebben klinische mastitis rondom de partus of hebben een niet-functioneel ('blind') kwartier. In Vlaanderen heeft een derde van de pasgekalfde vaarzen een celgetal boven de 150.000 cellen/ml, wat de aanwezigheid van IMI rondom het afkalven suggereert (De Vlieghe et al., 2001). Deze aandoening, die vaarzenmastitis wordt genoemd, bedreigt de productiviteit en de uiergezondheid tijdens de eerste en volgende lactaties (De Vlieghe et al., 2004; 2005a; 2005b) en leidt tot economische verliezen (Huijps et al., 2009).



**Tabel 1. Intramammaire infecties post partum van 708 kwartieren van vaarzen in Vlaanderen. Infectiestatus gebaseerd op twee melkmonsters genomen op dag 1-4 en dag 5-8 na het afkalven (Piepers et al., 2010).**

Intramammaire infectie status	Aantal kwartieren	Celgetal dag 1-4	Celgetal dag 5-8
Negatief	288	234	72
CNS dag 1-4	148	329	109
CNS dag 5-8	90	381	104
CNS 2x positief	105	346	152
Major pathogeen dag 1-4	48	1.353	365
Major pathogeen 5-8	16	319	142
Major pathogeen 2x positief	13	2.823	931

CNS zijn de belangrijkste veroorzakers van subklinische mastitis bij pasgekalvde vaarzen, terwijl *S. aureus* en omgevingspathogenen een minderheid van de infecties veroorzaken (Fox, 2009), ook in Vlaanderen (Piepers et al., 2010, 2011) (Tabel 1). Klinische mastitis wordt bij vaarzen, net zoals bij oudere koeien, in hoofdzaak veroorzaakt door de zogenaamde major pathogenen. De grootte van de impact van vaarzenmastitis voor een individueel dier wordt onder andere beïnvloed door de vorm (klinisch versus subklinisch), de virulentie van de betrokken bacteriën (major versus minor pathogeen), het tijdstip van het ontstaan van de infectie vóór het afkalven, de genezing of persistentie van de IMI tijdens de lactatie en de weerstand van de vaars (Piepers et al., 2009a, 2009b). Subklinische vaarzenmastitis veroorzaakt door CNS lijkt alleszins niet te leiden tot een lagere productiviteit van de dieren (Piepers et al., 2010; zie infra). Op bedrijfsniveau hangt de impact van vaarzenmastitis af van de prevalentie en incidentie, de vorm (klinische mastitis of subklinische mastitis), de betrokken mastitisveroorzakers (major of minor pathogenen), de manier waarop de dieren omgaan met de infecties en het antwoord dat de manager/veehouder klaar heeft om het probleem aan te pakken via aanpassingen van het management (De Vlieghe et al., 2012).

Specifieke adviezen om vaarzenmastitis te voorkomen en onder controle te houden maken geen onderdeel uit van het NMC-mastitis-preventieprogramma (NMC, 2013). De algemene basisprincipes wat betreft de preventie en controle van vaarzenmastitis zijn onder andere het tegengaan van het zuigen aan de uiers tussen jonge vaarzen, het toepassen van een efficiënte vliegenbestrijding, het geven van een uitgebalanceerde voeding zonder tekorten en de optimalisatie van comfort en hygiëne van de huisvesting, zeker in de periode rond de partus. Gezien de grote variatie in de uiergezondheid in de vroege lactatie tussen vaarzen op hetzelfde bedrijf, en dus onder hetzelfde management, (De Vlieghe et al., 2004) werd de hypothese getest dat naast management ook de genetische opmaak van de dieren een rol speelt. Een zogenaamd "single-nucleotide polymorphism" (SNP of mutatie) in het CXCR1-gen (het gen dat codeert voor

de IL-8-receptor op neutrofielen) op locatie c980 is op pathogeenspecifieke wijze geassocieerd met de gevoeligheid voor IMI. Vaarzen met het genotype AG zijn minder vaak geïnfecteerd met major mastitispathogenen in vroege lactatie dan vaarzen met het genotype GG, maar niet met CNS (Verbeke et al., 2012).

Meer specifieke maatregelen om IMI met major pathogenen, zoals *S. aureus*, te voorkomen zijn onder andere het bestrijden van vliegen, het vermijden van het contact met lacterende dieren vóór het afkalven en het vermijden van al teveel uieroedeem. Slechte hygiëne bij de vaarzen en het niet-supplementeren van de dieren tijdens de late dracht met vitaminen en mineralen verhoogt dan weer de kans op IMI met pathogenen, zoals *S. uberis*. Het voorkomen van infecties met CNS bij vaarzen in vroege lactatie vereist een propere huisvesting van de dieren, het scheren van de uiers en het dippen van de spenen vóór het afkalven (Piepers et al., 2011).

Het behandelen van vaarzen met antibiotica vóór het afkalven werd vroeger voorgesteld als een eenvoudige en effectieve methode om vaarzenmastitis onder controle te brengen. Positieve effecten op lange termijn wat betreft uiergezondheid en melkproductie werden echter soms wel (Sampimon et al., 2009a) en soms niet vastgesteld (Borm et al., 2009; Passchyn et al., 2013). Een algemeen advies om alle vaarzen te behandelen vóór de partus wordt derhalve alleen al omwille van economische redenen uitgesloten. Daarnaast zijn er momenteel geen diergeneesmiddelen geregistreerd voor intramammair en/of parenteraal gebruik bij drachtige vaarzen en bestaat er steeds een kans op de aanwezigheid van residuen in de melk bij het afkalven. Bovendien past het systematisch behandelen van vaarzen met antimicrobiële middelen vóór het afkalven ook niet binnen het verstandig omgaan met antibiotica en duurzame melkveehouderij. Een prepartum behandeling kan dus enkel als een tijdelijke oplossing dienen om een uitgesproken probleem van vaarzenmastitis (klinische mastitis of bij hoge prevalentie van major pathogenen) aan te pakken en dat in samenspraak met en onder toezicht van de bedrijfs(begeleidende) dierenarts. Tegelijkertijd moet een bedrijfsaanpak geformuleerd worden om

IMI bij vaarzen te voorkomen. Wanneer CNS de oorzaak zijn van vaarzenmastitis dan is behandelen zelfs ongewenst.

## NIEUWE INZICHTEN IN HET BELANG VAN COAGULASENEGATIEVE STAFYLOKOKKEN

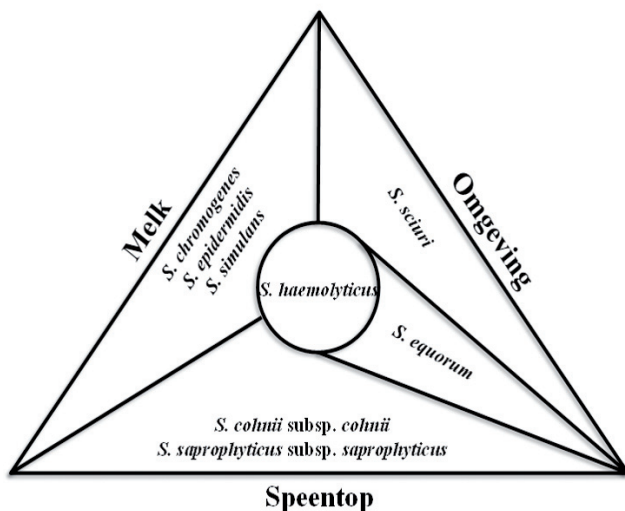
Heel wat verschillende bacteriesoorten zijn in staat IMI te veroorzaken. Door het onder controle brengen van belangrijke pathogenen, zoals *S. aureus* en *S. agalactiae*, is in vele regio's in de wereld het tankmelkcelgetal gedaald. Tegelijkertijd werd echter een toename vastgesteld in zowel absolute aantallen als het percentage van de belangrijkste mastitisverwekkers, de zogenoemde omgevingspathogenen, zoals *S. uberis* en *Klebsiella* spp., en CNS. Vandaag zijn CNS op heel wat goed geleide bedrijven die het standaardmastitispreventieprogramma toepassen van de NMC (NMC, 2013) zelfs de meest voorkomende oorzaak geworden van subklinische mastitis, ook in Vlaanderen (Piepers et al., 2007).

CNS worden als groep nog steeds gezien als minder belangrijk voor de uiergezondheid van koeien terwijl coagulasepositieve stafylokokken, waaronder *S. aureus*, gezien worden als major pathogenen. Als groep veroorzaken CNS een matige stijging van het celgetal maar toch worden ze ook als oorzaak van milde gevallen van klinische mastitis gerapporteerd. Daarnaast worden ook positieve eigenschappen toegedicht aan CNS, gezien kwartieren met een CNS-IMI beschermd lijken tegen infectie met major pathogenen, ook al is de literatuur daar niet eenduidig over (Reyher et al., 2012). Alles bij elkaar genomen, is de informatie over het belang van CNS voor de uiergezondheid verwarrend.

Het belang van CNS als groep werd recentelijk gedetailleerd bestudeerd op basis van een grote dataset waarin de oorzaken van IMI vergeleken werden met de koecelgetallen (Schukken et al., 2009). Enkel data van koeien waarvan het celgetal en de melkproductie beschikbaar waren en waarvan het bacteriologisch onderzoek van de melk (koestaal) slechts één bacterie aanduidde (of waarbij de uitslag negatief was) werden opgenomen voor verdere analyse. In totaal waren 352.614 datapunten van 4200 bedrijven beschikbaar. Binnen deze bedrijven was gemiddeld 15% van de koeien die bemonsterd werden, geïnfecteerd met CNS (schaal 0-100%). De gemiddelde binnenbedrijfsprevalentie van koeien die met CNS geïnfecteerd waren en ook een koecelgetal hadden boven 200.000 cellen/ml melk, was echter maar 2% (schaal 0-50%). De statistische analyse ('linear mixed models') toonde aan dat niet-geïnfecteerde koeien het laagste celgetal hadden, terwijl koeien geïnfecteerd met *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp. en *S. aureus* de hoogste celgetallen hadden. Tussen beide zaten de koeien die met CNS of *Corynebacterium bovis* geïnfecteerd waren en een celgetal hadden dat matig verhoogd was. De melkproductie van de CNS-geïnfecteerde

koeien lag echter hoger dan die van de niet-geïnfecteerde koeien terwijl de melkproductie sterk onderdrukt was bij koeien met een IMI veroorzaakt door één van voorgenoemde major pathogenen (Schukken et al., 2009). Er werd een vergelijkbare bevinding gedaan in een studie die werd opgezet om het pathogeenspecifieke belang van vaarzenmastitis te kwantificeren (Piepers et al., 2010). Vaarzen met CNS-IMI in vroege lactatie produceren meer dan niet-geïnfecteerde vaarzen. Een klein deel van de verklaring is toe te schrijven aan het feit dat CNS-geïnfecteerde vaarzen ook minder kans maken op klinische mastitis tijdens de lactatie en dus minder productieverliezen kennen. Dit kon bij de verdere analyse van de data echter niet bevestigd worden (Piepers et al., 2013). IMI met *Staphylococcus caprae* bij geiten is geassocieerd met een gestegen melkproductie en *S. xylosus* met een gedaalde melkproductie (Koop et al., 2012). In een studie van Schukken et al. (2009) blijkt de procentuele bijdrage tot het tankmelkcelgetal van koeien met CNS-IMI 17,9% op een selecte groep van bedrijven met een tankmelkcelgetal onder de 200.000 cellen/ml. De bijdrage tot het tankmelkcelgetal van koeien met CNS-IMI is veel lager op bedrijven met een tankmelkcelgetal tussen 200.000 en 400.000 cellen/ml en boven 400.000 cellen/ml, respectievelijk 11,9 en 7,9%. Slechts weinig melkveebedrijven hebben problemen met de melkkwaliteit in het algemeen en het tankmelkcelgetal in het bijzonder ten gevolge van CNS-IMI. Anderzijds moeten bedrijven met een laag tankmelkcelgetal rekening houden met de impact van CNS-IMI.

De CNS-groep bestaat uit meer dan vijftig verschillende species en subspecies en er worden nog regelmatig nieuwe species bij koeien ontdekt (Supré et al., 2010; Taponen et al., 2012). Ongeveer tien CNS-soorten zijn regelmatig de oorzaak van IMI bij melkkoeien (Zadoks en Watts, 2009). Een deel van de verwarring die in de literatuur bestaat rond het belang van CNS (oorzaak van klinische mastitis versus bescherming) zou verklaard kunnen worden door soortverschillen. Om soortspecifiek onderzoek te kunnen uitvoeren moet de differentiatie van de verschillende species (of soorten) echter gebeuren met accurate testen. Dit was tot voor kort een probleem gezien vaak gebruik gemaakt werd van fenotypische testkits. Deze testen werden op punt gesteld voor de differentiatie van CNS-soorten van humane oorsprong, maar ze zijn te weinig sensitief en hebben slechts lage, positief voorspellende waarden voor CNS afkomstig van koeien en geiten, wat hun praktische bruikbaarheid tenietdoet (Sampimon et al., 2009; Koop et al., 2013). Tegenwoordig beschikt men over moleculaire technieken die op basis van genetisch materiaal differentiëren tussen de vele soorten (Supré et al., 2009; Piessens et al., 2010; Braem et al., 2011) en de vergelijking doorstaan met de gouden standaard. In veel gevallen is de gouden standaard gensequencing van het 16S-gen (Zadoks en Watts, 2009). Deze moleculaire testmethoden worden nu volop ingezet om CNS-speciesspecifieke aspecten te bestuderen.



**Figuur 7.** Distributie van de meest prevalentie coagulase-negatieve stafylokokken over verschillende niches (melk, omgeving en speentoppen) zoals vastgesteld in een longitudinale studie op zes Vlaamse melkveebedrijven (naar Braem, 2012).

De verdeling van de CNS-soorten in melk (Supré et al., 2011) en in andere niches, zoals stalomgeving (Piessens et al., 2011) en de speentoppen van koeien (Braem et al., 2013), zijn recentelijk gedetailleerd beschreven in de zoektocht naar de bronnen en vectoren voor CNS die frequent IMI veroorzaken (Figuur 7). *S. chromogenes* en *S. epidermidis* blijken geadapteerd te zijn aan de uier, terwijl andere soorten zoals *S. haemolyticus* eerder opportunistische pathogenen zijn. *Staphylococcus equorum*, *S. sciuri* en *S. fleurettii* worden dan weer gezien als typische omgevingskiemen die aanwezig zijn in de stalomgeving van de dieren. Er moet echter nog verder werk geleverd worden om deze resultaten te bevestigen en om tot betere conclusies te komen. Er wordt immers vermoed dat er ook nog verschillen bestaan tussen stammen binnen de soorten. Een belangrijke conclusie is dat de verdeling van de CNS-soorten bedrijfs-specifiek is, wat aangeeft dat ook bedrijfsfactoren gezocht moeten worden die deze bevindingen kunnen verklaren. De identificatie van koe- en kwartierfactoren verklaart daarnaast waarom bepaalde koeien en kwartieren wel of niet geïnfecteerd zijn of worden met bepaalde CNS-soorten.

De speciesspecifieke impact van CNS-IMI met behulp van moleculair geïdentificeerde CNS-stalen is slechts beperkt bestudeerd. Echter, uit een longitudinale veldstudie blijkt dat door CNS-IMI het kwartiercelgetal bij melkvee stijgt tot een niveau dat tussen dat van niet-geïnfecteerde kwartieren en kwartieren met IMI veroorzaakt door major pathogenen ligt (Supré et al., 2011). Alle CNS-species blijken daarnaast ook in staat te zijn om persisterend MI te veroorzaken, met *S. chromogenes* als een van de belangrijkste.

Natuurlijk voorkomende CNS-IMI beschermt tegen experimentele of natuurlijke nieuwe IMI met major pathogenen (Nickerson en Boddie, 1994;

Matthews et al., 1991; Schukken et al., 1999). Ook tepeltopkolonisatie met CNS heeft een beschermend effect tegenover nieuwe IMI met major pathogenen. Zo hebben de kwartieren van vaarzen waarvan de tepels vóór het afkalven gekoloniseerd zijn met *S. chromogenes*, vaker een celgetal dat lager ligt dan 200.000 cellen/ml in vroege lactatie dan kwartieren waarvan de tepeltoppen niet gekoloniseerd zijn door dit species (De Vlieghe et al., 2003b). Deze bevinding wordt bevestigd in een studie van Piepers et al., (2011): kwartieren van vaarzen hebben een lagere kans op IMI met major pathogenen na het afkalven als de speentoppen gekoloniseerd zijn met CNS vóór het afkalven. Potentiële mechanismen die deze bevindingen kunnen verklaren zijn competitieve exclusie, de productie van inhiberende substanties, zoals bacteriocinen, en de stimulatie van lokale immuniteit. Bij vaarzen zijn er in de melk van kwartieren met een door CNS-gekoloniseerde speentop meer neutrofielen aanwezig dan in de melk van kwartieren zonder gekoloniseerde speentop (Piepers et al., 2009b), wat in de richting van een verbeterde lokale immuniteit wijst. Andere studies echter kunnen de bescherming uitgaande van een bestaande CNS-IMI tegenover nieuwe IMI veroorzaakt door major pathogenen niet bevestigen (Zadoks et al., 2001b). Uit nog andere studies blijkt zelfs dat CNS-geïnfecteerde kwartieren gevoeliger zijn voor nieuwe IMI met belangrijke pathogenen (Hogan et al., 1988). Dit doet besluiten dat de rol van CNS-IMI en tepeltopkolonisatie met CNS voor wat betreft mogelijke bescherming onbepaald blijft en nog verder moet onderzocht worden.

## DANKBETUIGING

De auteurs betuigen dank aan de Franquistichting voor het verlenen van de Franquichair aan YHS.

De auteurs willen ook hun collega's en onderzoekspartners bedanken voor de hulp en enthousiaste bijdragen tot het uiergezondheidsonderzoek van de afgelopen jaren.

## REFERENTIES

- Almeida R.A., Dogan B., Klaessing S., Schukken Y.H., Oliver S.P. (2011). Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. *Veterinary Research Communications* 35, 89-101.
- Bannerman D.D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science* 87, 10-25.
- Bar D., Gröhn Y.T., Bennett G., González R.N., Hertl J.A., Schulte H.F., Tauer L.W., Welcome F.L., Schukken Y.H. (2004). Effects of repeated episodes of generic clinical mastitis on mortality and culling in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91, 2196-2204.
- Barlow J.W., White L.J., Zadoks R.N., Schukken Y.H. (2009). A mathematical model demonstrating indirect and overall effects of lactation therapy targeting sub-



- clinical mastitis in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 90, 31-42.
- Barlow J.W., Zadoks R.N., Schukken Y.H. (2013). Effect of lactation therapy on *Staphylococcus aureus* transmission dynamics in two commercial dairy herds. *BMC Veterinary Research* 11, 9-28.
- Borm A.A., Fox L.K., Leslie K.E., Hogan J.S., Andrew S.M., Oliver S.P., Schukken Y.H., Hancock D.D., Gaskins C.T., Owens W.E., Norman C. (2006). Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 89, 2090-2098.
- Bouwstra R.J., Nielen M., Stegeman J.A., Dobbelaar P., Newbold J.R., Jansen E.H., van Werven T. (2010). Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part I: adverse effect on incidence of mastitis postpartum in a double-blind randomized field trial. *Journal of Dairy Science* 93, 5684-5695.
- Bradley A.J., Green M.J. (2004). The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 20, 547-568.
- Braem G., De Vliegheer S., Supré K., Haesebrouck F., Leroy F., De Vuyst L. (2011). (GTG)-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. *Veterinary Microbiology* 147, 67-74.
- Braem G. (2012). Prevalence of coagulase-negative staphylococci on the teat skin of cows in Flemish dairy herds. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of PhD in Bioengineering Sciences.
- Braem G., De Vliegheer S., Verbist B., Piessens V., Van Coillie E., De Vuyst L., Leroy F. (2013). Unraveling the microbiota of teat apices of clinically healthy lactating dairy cows, with special emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science* 96, 1499-1510.
- de Haas Y., Veerkamp R.F., Barkema H.W., Gröhn Y.T., Schukken Y.H. (2004). Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *Journal of Dairy Science* 87, 95-105.
- De Vliegheer S., Laevens H., Opsomer G., De Muëlenaere E., de Kruif A. (2001). Somatic cell counts in dairy heifers during early lactation. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 70, 212-215.
- De Vliegheer S., Goossens X., Mijten E., Opsomer G., De Meulemeester L., de Kruif A. (2003a). *Streptococcus agalactiae* mastitis bij melkvee. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 72, 102-107.
- De Vliegheer S., Laevens H., Devriese L.A., Opsomer G., Leroy J.L.M., H.W. Barkema, A. de Kruif. (2003b). Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Veterinary Microbiology* 92, 245-252.
- De Vliegheer S., Barkema H.W., Stryhn H., Opsomer G., de Kruif. (2004a). Impact of early lactation somatic cell count in heifers on somatic cell counts over the first lactation. *Journal of Dairy Science* 87, 3672-3682.
- De Vliegheer S., Laevens H., Barkema H.W., Dohoo I., Stryhn H., Opsomer G., de Kruif A. (2004b). Management practices and heifer characteristics associated with early lactation somatic cell counts of dairy heifers in Belgium. *Journal of Dairy Science* 87, 937-947.
- De Vliegheer S., Barkema H.W., Stryhn H., Opsomer G., de Kruif A. (2005a). Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. *Journal of Dairy Science* 88, 938-947.
- De Vliegheer S., Barkema H.W., Opsomer G., de Kruif A., Duchateau L. (2005b). Association between early lactation somatic cell count and culling of dairy heifers using Cox frailty models. *Journal of Dairy Science* 88, 569-576.
- De Vliegheer S., Fox L.K., Piepers S., McDougall S., Barkema H.W. (2012). *Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control.* *Journal of Dairy Science* 95, 1025-1040.
- Detilleux J., Vangroenweghe F., Burvenich C. (2006). Mathematical model of the acute inflammatory response to *Escherichia coli* in intramammary challenge. *Journal of Dairy Science* 89, 3455-3465.
- Dogan B., Klaessig S., Rishniw M., Almeida R., Oliver S.P., Simpson K.W., Schukken Y.H. (2006). Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 116, 270-282.
- Döpfer D., Barkema H.W., Lam T.J., Schukken Y.H., Gaastra W. (1999). Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82, 80-85.
- Fox L.K. (2009). Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Veterinary Microbiology* 134, 82-88.
- Gröhn Y.T., Wilson D.J., González R.N., Hertl J.A., Schulte H., Bennett G., Schukken Y.H. (2004). Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 3358-3374.
- Gröhn Y.T., González R.N., Wilson D.J., Hertl J.A., Bennett G., Schulte H., Schukken Y.H. (2005). Effect of pathogen-specific clinical mastitis on herd life in two New York State dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 71, 105-125.
- Günther J., Esch K., Poschadel N., Petzl W., Zerbe H., Mitterhuemer S., Blum H., Seyfert H.M. (2011). Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity* 79, 695-707.
- Gurjar A., Gioia G., Schukken Y.H., Welcome F., Zadoks R.N., Moroni P. (2012). Molecular diagnostics applied to mastitis problems on dairy farms. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28, 565-576.
- Hogan J.S., Smith K.L., Todhunter D.A., Schoenberger P.S. (1988). Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. *Journal of Dairy Science* 71, 2520-2525.
- Huijps K., De Vliegheer S., Lam T., Hogeveen H. (2009). Cost estimation of heifer mastitis in early lactation by stochastic modelling. *Veterinary Microbiology* 134, 121-127.
- Koop G., De Vliegheer S., De Visscher A., Supré K., Haesebrouck F., Nielen M., van Werven T. (2012). Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science* 95, 5075-5084.
- Koop G., De Visscher A., Collar C.A., C. Bacon D.A., Maga E.A., Murray J.D., Supré K., De Vliegheer S., Haesebrouck F., Rowe J.D., Nielen M., and van Werven T. (2013). Identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from goat milk with API staph and with transfer RNA-in-

- tergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Science* 95, 7200-7205.
- Koskinen M.T., Wellenberg G.J., Sampimon O.C., Holopainen J., Rothkamp A., Salmikivi L., van Haeringen W.A., Lam T.J., Pyörälä S. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science* 93, 5707-5715.
- Lam T.J., DeJong M.C., Schukken Y.H., Brand A. (1996). Mathematical modeling to estimate efficacy of postmilk-ing teat disinfection in split-udder trials of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 79, 62-70.
- Mahmmod Y.S., Klaas I.C., Nielsen S.S., Katholm J., Toft N. (2013). Effect of presampling procedures on real-time PCR used for diagnosis of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* in dairy cows at routine milk recordings. *Journal of Dairy Science* 96, 2226-2233.
- Matthews K.R., Harmon R.J., Langlois B.E. (1991). Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococci infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. *Journal of Dairy Science* 74, 1855-1859.
- Nickerson S.C., Boddie R. L. (1994). Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 77, 2526-2536.
- NMC - A global organization for mastitis control and milk quality. (2013). Recommended mastitis control program. [www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf](http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf)
- Passchyn P., Piepers S., De Vliegheer S. (2013). Systemic prepartum treatment of end-term dairy heifers with penethamate hydriodide: effect on udder health, milk yield and culling until 120 days in milk. *Journal of Dairy Science*, Aug. 8. pii: S0022-0302(13)00546-8. doi: 10.3168/jds.2013-6626. [Epub ahead of print].
- Piepers S., De Meulemeester L., de Kruif A., Opsomer G., Barkema H.W., De Vliegheer S. (2007). Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research* 74, 478-483.
- Piepers S., De Vliegheer S., de Kruif A., Opsomer G., Barkema H. W. (2009a). Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. *Veterinary Microbiology* 134, 113-120.
- Piepers S., Opsomer G., Meyer E., Demeyere K., Barkema H. W., de Kruif A., De Vliegheer S. (2009b). Heifer and quarter characteristics associated with periparturient blood and milk neutrophil apoptosis in healthy heifers and in heifers with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 92, 4330-4339.
- Piepers S., Opsomer G., Barkema H.W., de Kruif A., S. De Vliegheer. (2010). Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than non-infected heifers. *Journal of Dairy Science* 93, 2014-2024.
- Piepers S., Peeters K., Opsomer G., Barkema H. W., Franken K., S. De Vliegheer. (2011). Pathogen group specific risk factors at the herd, heifer and quarter level for intramammary infections in early lactating dairy heifers. *Preventive Veterinary Medicine* 99, 91-101.
- Piepers S., Schukken Y.H., Passchyn P., De Vliegheer S. (2013). The impact of intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in early lactating heifers on milk yield throughout first lactation revisited. *Journal of Dairy Science* 96, 5095-5105.
- Piessens V., Supré K., Heyndrickx M., Haesebrouck F., De Vliegheer S., E. Van Coillie. (2010). Validation of amplified fragment length polymorphism genotyping for species identification of bovine associated coagulase-negative staphylococci. *Journal of Microbiological Methods* 80, 287-294.
- Piessens V., Van Coillie E., Verbist B., Supré K., Braem G., Van Nuffel A., De Vuyst L., Heyndrickx M., De Vliegheer S. (2011). Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science* 94, 2933-2944.
- Piessens V., De Vliegheer S., Verbist B., Braem G., Van Nuffel A., De Vuyst L., Heyndrickx M., Van Coillie E. (2012). Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *Journal of Dairy Science* 95, 7027-7038.
- Quesnell R.R., Klaessig S., Watts J.L., Schukken Y.H. (2012). Bovine intramammary *Escherichia coli* challenge infections in late gestation demonstrate a dominant anti-inflammatory immunological response. *Journal of Dairy Science* 95, 117-126.
- Rambeaud M., Almeida R.A., Pighetti G.M., Oliver S.P. (2003). Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Veterinary Immunology Immunopathology* 96, 193-205.
- Reyher K.K., Haine D., Dohoo I.R., Revie C.W. (2012). Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens- A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 95, 6483-6502.
- Sampimon O.C., De Vliegheer S., Barkema H. W., Sol J., T. J. G. M. Lam. (2009a). Effect of prepartum dry cow antibiotic treatment in dairy heifers on udder health and milk production. *Journal of Dairy Science* 92, 4395-4403.
- Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vliegheer S., Supré K., Haesebrouck F., Barkema H.W., Sol J., Lam T.J.G.M. (2009b). Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology* 136, 300-305.
- Sampimon O.C., Lam T.J., Mevius D.J., Schukken Y.H., Zadoks R.N. (2011). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology* 150, 173-179.
- Schukken Y.H., Leslie K.E., Barnum D.A., Mallard B.A., Lumsden J.H., Dick P.C., Vessie G.H., Kehrli M.E. (1999). Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *Journal of Dairy Science* 82, 2393-2401.
- Schukken, Y.H., Gonzalez R.N., Tikofsky L.L., Schulte H.F., Santisteban C.G., Welcome F.L., Bennett G.J., Zurawski M.J., Zadoks R.N. (2009). CNS mastitis: Nothing to worry about? *Veterinary Microbiology* 134, 9-14.
- Schukken Y.H., Moroni P., Zadoks R.N. (2011a). New technologies to improve milk quality and udder health on dairy farms. In: *Proceedings Annual Meeting National Mastitis Council*. pp 82-92.
- Schukken Y.H., Günther J., Fitzpatrick J., Fontaine M.C., Goetze L., Holst O., Leigh J., Petzl W., Schuberth H.J., Sipka A., Smith D.G., Quesnell R., Watts J., Yancey R., Zerbe H., Gurjar A., Zadoks R.N., Seyfert H.M.; members of the Pfizer mastitis research consortium. (2011b). Host-response patterns of intramammary infections in

- dairy cows. *Veterinary Immunology Immunopathology* 144, 270-289.
- Suojala L., Orro T., Järvinen H., Saatsi J., Pyörälä S. (2008). Acute phase response in two consecutive experimentally induced *Escherichia coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50, 18-27.
- Supré K., De Vliegher S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., Vaneechoutte M., Baele M., De Graef E., Piepers S., F. Haesebrouck. (2009). Technical note: Use of transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative *Staphylococcus* species originating from bovine milk and teat apices. *Journal of Dairy Science* 92, 3204-3210.
- Supré K., De Vliegher S., Cleenwerck I., Engelbeen K., Van Trappen S., Piepers S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vos P., F. Haesebrouck. (2010). *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2739-2744.
- Supré K., Haesebrouck F., Zadoks R.N., Vaneechoutte M., Piepers S., De Vliegher S. (2011). Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science* 94, 2329-2340.
- Swinkels J.M., Hogeveen H., Zadoks R.N. (2005a). A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 88, 4273-4287.
- Swinkels J.M., Rooijendijk J.G., Zadoks R.N., Hogeveen H. (2005b). Use of partial budgeting to determine the economic benefits of antibiotic treatment of chronic subclinical mastitis caused by *Streptococcus uberis* or *Streptococcus dysgalactiae*. *Journal of Dairy Research* 72, 75-85.
- Taponen S., Salmikivi L., Simojoki H., Koskinen M.T., Pyörälä S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science* 92, 2610-2617.
- Taponen S., Supré K., Piessens V., Van Coillie E., De Vliegher S., Koort J. (2012). *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 61-65.
- Tassi R., McNeilly T. N., Fitzpatrick J. L., Fontaine M. C., Reddick D., Ramage C., Lutton M., Schukken Y.H., Zadoks R.N. (2013). Strain specific pathogenicity of putative host-adapted and non-adapted strains of *Streptococcus uberis* in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 96, 5129-5145.
- Tuchscher L.P., Buzzola F.R., Alvarez L.P., Lee J.C., Sordelli D.O. (2008). Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. *Infection and Immunology* 76, 5738-5744.
- Verbeke J., Piepers S., Peelman L., Van Poucke M., De Vliegher S. (2012). Pathogen-group specific association between CXCR1 polymorphisms and subclinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Research* 79, 341-351.
- Werling D., Jann O.C., Offord V., Glass E.J., Coffey T.J. (2009). Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends in Immunology* 30, 124-130.
- White L.J., Lam T.J., Schukken Y.H., Green L.E., Medley G.F., Chappell M.J. (2006). The transmission and control of mastitis in dairy cows: a theoretical approach. *Preventive Veterinary Medicine* 74, 67-83.
- White L.J., Schukken Y.H., Dogan B., Green L., Döpfer D., Chappell M.J., Medley G.F. (2010). Modelling the dynamics of intramammary *Escherichia coli* infections in dairy cows: understanding mechanisms that distinguish transient from persistent infections. *Veterinary Research* 41, 13-28.
- Wilson D.J., González R.N., Hertl J., Schulte H.F., Bennett G.J., Schukken Y.H., Gröhn Y.T. (2004). Effect of clinical mastitis on the lactation curve: a mixed model estimation using daily milk weights. *Journal of Dairy Science* 87, 2073-2084.
- Zadoks R.N., Allore H.G., Barkema H.W., Sampimon O.C., Gröhn Y.T., Schukken Y.H. (2001a). Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *Journal of Dairy Science* 84, 590-599.
- Zadoks R.N., Allore H.G., Barkema H.W., Sampimon O.C., Wellenberg G.J., Grohn Y.T., Schukken Y.H. (2001b). Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 84, 2649-2663.
- Zadoks R.N., Allore H.G., Hagenaars T.J., Barkema H.W., Schukken Y.H. (2002). A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. *Epidemiology and Infection* 129, 397-416.
- Zadoks R.N., Schukken Y.H. (2006). Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 22, 229-261.
- Zadoks R.N., Watts J. L. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology* 134, 20-28.
- Zadoks R.N., Griffiths H.M., Munoz M.A., Ahlstrom C., Bennett G.J., Thomas E., Schukken Y.H. (2011a). Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *Journal of Dairy Science* 94, 1045-1051.
- Zadoks R.N., Middleton J.R., McDougall S., Katholm J., Schukken Y.H. (2011b). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16, 357-372.